

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 485 927

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 15041

(54) Composition cosmétique à base d'un complexe enzymatique à action hydrolysante sur l'AMPC.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). A 61 K 37/54, 7/06.

(22) Date de dépôt..... 7 juillet 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 1 du 8-1-1982.

(71) Déposant : LAPINET Eugène, résidant en France.

(72) Invention de : Eugène Lapinet.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Eugène Lapinet,
1, rue du Commandant-Guilbaud, 75016 Paris.

La présente invention a pour objet une composition cosmétique à base d'un complexe enzymatique à action hydrolysante sur l'AMPc, et son utilisation notamment dans le contrôle de la pousse des poils.

- 5 Il a été démontré ces dernières années le rôle régulateur de l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) dans le métabolisme cellulaire. Ce cyclophosphate se trouve dans presque toutes les cellules animales. L'AMPc est formé dans la cellule à partir de l'adénosine triphosphate par l'adényl-cyclase sous
10 l'influence hormonale. L'AMPc est ensuite hydrolysé par un autre groupe d'enzymes de type phosphodiésterasique. Il a été démontré que l'activité cellulaire dépend de la concentration de l'AMPc ("Cyclic AMP" par R.W.Butcher et E.W.Sutherland, Academic Press, New York, 1971). On a pu prouver que l'augmen-
15 tation de la concentration de l'AMPc entraîne l'augmentation des fonctions sépcifiques de la cellule tandis que la diminution de cette concentration freine ces mêmes fonctions.

- Plus récemment on a établi la présence dans la peau humaine et animale de l'adényl cyclase et de la phosphodiésterase
20 (PDE) (Mier and Urselman, Br. J. Derm., 359,1970). L'activité phosphodiésterasique a été trouvée dans presque tous les tissus animaux étudiés et dans certains tissus végétaux. Les essais de purification de cet enzyme se sont heurtés à l'observation de formes multiples selon le tissu ou la méthode
25 de utilisée ; d'autre part, lors de la purification, le produit final perdait sa stabilité. Jusqu'à ce jour, il n'existe pas de preuve scientifique montrant si l'AMPc est impliqué dans le mécanisme de la pousse du poil.

- On a maintenant trouvé qu'un complexe anzymatique ayant une
30 action hydrolysante sur l'AMPc, obtenu par extraction du cerveau, lors de son application locale sur la peau, freine substantiellement la repousse du poil et peut être utilisé en cosmétique.

- La présente invention a donc pour objet l'application en cosmétique d'un complexe enzymatique à action hydrolysante sur
35

l'AMPc, et en particulier son utilisation dans le contrôle de la pousse des poils.

Ce complexe enzymatique, doué d'activité phosphodiésterasique, existe en très faible quantité dans la plupart des tissus animaux et végétaux, la concentration la plus élevée se trouvant dans le cerveau des mammifères.

Son extraction peut être effectuée de manière connue, par exemple à partir de tissus d'animaux selon la méthode de R.W. Butcher et E.W.Sutherland (J.Biol.Chem. vol 237, n°4, avril 1962, P. 1244-50). Cette méthode consiste à broyer à basse température dans une solution tampon un tissu animal fraîchement prélevé, filtrer, centrifuger, filtrer à nouveau, et précipiter le filtrat par une solution de sulfate d'ammonium saturée. Les opérations de filtration et de précipitation peuvent être répétées et le précipité peut être soumis à d'autres purifications habituelles des protéines, puis lyophilisé. Le meilleur rendement est obtenu à partir du cerveau de boeuf ou de mouton. Le complexe enzymatique peut aussi être isolé des végétaux, notamment des algues, mais avec un faible rendement (Razzel W.E., Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 243, 1966 et Harvey C., Coll Biochem. 6, 3689, 1967).

Le complexe enzymatique utilisable selon l'invention, est caractérisable par son activité phosphodiésterasique hydrolysante sur l'AMPc qui peut être dosée par la méthode de Cheung (Biochim. Biophys. Acta, 191, 1969, p.303). L'unité enzymatique est définie comme la quantité provoquant la destruction d'un micromole d'AMPc par minute à 30°. L'activité du complexe enzymatique obtenu sous forme lyophilisée est de l'ordre de 0,1 à 0,4 unités par mg.

L'exemple suivant illustre une méthode d'obtention du complexe enzymatique à action phosphodiésterasique hydrolysante sur l'AMPc.

Exemple de préparation

- 150 g de tissu du cerveau de mouton fraîchement prélevé après nettoyage est broyé à basse température (4°C) avec un broyeur du type mixer dans 300 ml d'une solution tampon à base de
- 5 trométhamine ("Tris") de pH 7,5 (Tris, HCl pH 7,5 20mM, Mg Cl₂ 1mM, 2-mercapto-éthanol 3mM, EGTA 0,1mM). (EGTA = éthylèneglycol bis-(2-aminoéthylester) NN'tétraacétique acid).
- Après filtration, le filtrat est centrifugé deux heures à 20.000 tours et le surnageant est de nouveau filtré sur
- 10 laine de verre. Le filtrat est ensuite précipité lentement dans une solution de sulfate d'ammonium saturé (1:1) à pH 7,5. Après agitation pendant trente minutes, il est de nouveau soumis à la centrifugation pendant trente minutes à 20.000 tours minute. Le précipité est ensuite redissous dans le tampon
- 15 trométhamine (Tris) et dialysé deux fois (huit heures) contre deux litres de tampon. Après congélation, le dialysat est soumis à la lyophilisation. Le lyophilisat ainsi obtenu reste stable pendant plusieurs mois à -20°C.

- Le dosage de l'activité phosphodiésterasique de ce lyophilisat
- 20 sur l'AMPc par la méthode de Cheung a montré que cette activité était de 0,3 unité par mg.

On obtient 150 mg de produit lyophilisé.

- Le complexe enzymatique hydrolysant l'AMPc (ci-après CEH) a été soumis à une étude expérimentale sur l'animal puis sur
- 25 la femme.

Expérimentation sur les rats et les lapins.

Plusieurs séries d'expériences ont été entreprises sur 36 rats mâles et 56 femelles ainsi que sur 8 lapins.

La technique a été la suivante :

- 30 On effectue une épilation à la cire symétriquement sur les deux côtés de l'animal, un côté servant de témoin et l'autre

à tester les différents produits utilisés qui pénètrent par ionisation grâce à une électrode à rouleau en éponge branchée sur un appareil galvanique.

Cette éponge est humectée avec le produit à tester.

5 Ampérage : 1 milliampère.

Temps de ionisation : 1 minute.

Les produits appliqués ont été successivement :

1. Complexe enzymatique hydrolysant (CEH) dans une solution tampon à pH 7,2.
- 10 2. Trypsine pure (1mg/ml) à titre de comparaison.
3. Trypsine pure (1mg/ml).
4. CEH (5mg/ml) + trypsine (1mg/ml).

5. CEH (2mg/ml) + imidazole (2mg/ml).

Pour déterminer l'action de ces différents produits sur la repousse du poil, nous avons :

- a) examiné tous les 2 jours la repousse des poils des 2 côtés et fait des photographies au 8ème et au 14ème jours après épilation.
- b) épilé à la main 50-100 poils des côtés traités et 50-100 poils du côté témoin, et pesé les poils aux 13ème, et 31ème jours après épilation.
- c) pratiqué des biopsies suivies de coupes histologiques examinées au microscope optique et certaines au microscope électronique.

25 Le tableau suivant (N°1) rapporte les résultats obtenus par la méthode de mesure du poids du poil après application du CEH ou d'autres enzymes comme la trypsine (avec ou sans imidazole c).

TABLEAU N° 1

EX. N°	Traitement	Nombre rats	Poids de 100 poils (en mg \pm)	% rapport témoin	Remarques	Observations
N°1	Témoins CEH (5mg/ml)	4 4	0,825 \pm 0,125 0,475 \pm 0,025	- 57%	2 applications à 9 jours d'intervalle mesuré au 13ème jour.	Nette diminution du nombre de poils par surface.
N°2	Témoins Trypsine (1mg/ml)	2 2	0,70 \pm 0,10 0,70 \pm 0,12	- 100%	Pesée le 13ème jour.	Pas d'effet.
N°3	Témoins Trypsine (1mg/ml)	2 2	1,75 \pm 0,12 1,30 \pm 0,1	- 74%	Pesée le 13ème jour.	Faible effet sans modification notable du nombre de poils par surface.
N°4	Témoins CEH + Trypsine (5mg + 1mg)	1 1	1,85 1,05	- 57%	Pesée le 13ème jour.	Même résultat que dans ex. N°1
N°5	Témoins CEH + imidazole (2mg + 2 mg)	6 6	5,32 \pm 0,27 3,15 \pm 0,40	- 59%	Pesée le 31ème jour.	Même résultat que dans ex. N°1

Comme on peut constater d'après ce tableau, le CEH a une action freinatrice nette sur la repousse du poil.

La repousse est d'abord retardée, le poil est plus petit (50 à 60% par rapport aux témoins) et le nombre de poils par surface a nettement diminué.

L'autre enzyme utilisé, la trypsine n'a pas cette action freinatrice et son addition n'augmente pas l'action de CEH.

Dans aucune des expériences on n'a constaté des effets toxiques ou allergisants.

10 Compte-rendu des coupes histologiques.

Coupe de la peau des rats témoins 4 jours après épilation :

Coupe n° 1 : La coupe histologique montre un certain nombre de follicules pileux en activité avec image de croissance des poils ; certains d'entre eux atteignant l'épithélium malpighien.

15

Coupe n° 3 (grossissement plus fort) : Cette coupe montre des images de croissance pileuse avec glandes sébacées bien développées appendues à la gaine du poil.

20

L'un des poils a presque atteint l'épithélium malpighien.

Coupe de la peau des rats traités 4 jours après épilation
(traitement avec CEH) :

5 Coupe n° 2 : La coupe montre quelques follicules pileux peu développés, situés profondément dans le derme et sans image de croissance pileaire. Les follicules pileux et l'épithélium malpighien sont séparés par une "zone vide".

10 Coupe n° 4 : (grossissement plus fort) : On observe 2 follicules pileux situés profondément dans le derme sans connection avec l'épithélium malpighien. On voit une section oblique de poil amorçant à peine sa croissance.

En résumé, retard important de la pousse par rapport au témoin.

Coupe de la peau des lapins témoins 4 jours après épilation :

15 Coupe n° L1 : Présence de follicules pileux actifs avec poils atteignant la surface épithéliale.
Rares glandes sébacées.

Coupe de la peau des lapins traités 4 jours après épilation
(traitement avec CEH) :

20 Coupe n° L2 : Les follicules pileux montrent par place des zones claires évoquant une vacuité de la gaine du poil.

Ces zones claires sont évidentes dans les 3 éléments observés.

25 On remarque la présence de cellules adipeuses nombreuses et situées assez haut dans le derme. (Ces cellules sont ordinairement situées plus profondément dans l'hypoderme).

30 On peut émettre l'hypothèse d'une dégénérescence graisseuse des cellules des follicules pileux.

Coupe n° L3 : Même aspect.

Avec cellules adipeuses.

Coupe de la peau du lapin traité avec CEH au microscope électronique.

Coupe ME1 : La coupe représente un poil dans sa gaine coupée longitudinalement.

5 La partie périphérique du poil entourant la moëlle apparaît homogène et foncée.

Coupe ME2 : L'image représente des cellules de la gaine du poil adjacente à un poil dont on voit la partie périphérique à droite. (On reconnaît cette partie

10 périphérique en se reportant à ME1).
On observe dans la cytoplasme des cellules de nombreuses inclusions lipidiques (22 dans le champ) évoquant une dégénérescence graisseuse.

Coupe ME3 : On observe un macrophage situé à proximité d'un

15 poil. Ce macrophage d'aspect actif et inhabituel à cet endroit présente de nombreuses microvillosités à sa surface et à l'intérieur de nombreuses inclusions lipidiques (14).
Cet aspect indique une activité macrophagique

20 intense au dépend du matériel lipidique.
Il est vraisemblable que ces lipides proviennent de la dégénérescence graisseuse des cellules de la gaine du poil voisin.

Conclusion.

25 L'étude histologique de la coupe des peaux des rats et des lapins montre un net retard de la croissance du poil.
L'observation des signes d'une dégénérescence graisseuse des cellules des follicules pileux, confirmée par l'étude au microscope électronique, pourrait être mise en relation avec

30 le retard observé dans la repousse du poil.

Etude expérimentale sur la peau de la Femme.

L'étude expérimentale de l'effet de CEH en comparaison avec la trypsine a été faite sur dix femmes. Ces patientes ont été choisies parmi celles qui n'ont pas réagi aux autres
5 traitements connus.

Après épilation à la cire, les substances utilisées étaient diluées dans une solution tampon à pH 7,8 et appliquées sur la peau en ionisation avec une électrode à rouleau reliée au pôle négatif de l'appareil galvanique.
10 Cet appareil produit un courant continu au maximum de 2 milli-ampères avec toutes les 10 secondes une inversion du courant de 1 seconde permettant la dépolarisation et de ce fait une meilleure pénétration des substances.

Les substances utilisées étaient les suivantes :

- 15 CEH (10 mg) + imidazole (10 mg) (dans 10 ml)
- CEH (10 mg)/10 ml
- CEH (20 mg)/10 ml
- trypsine à 15 mg/10 ml (comparaison)
- trypsine à 50 mg/10 ml (comparaison)

- 20 Alors que l'on n'a observé aucune action de la trypsine, on a pu constater que le CEH à 10 mg/10 ml a retardé la repousse du poil. L'effet du CEH à 20 mg était plus fort. Les poils repoussent plus fins et disparaissent dans certaines zones. Après trois séances, on a observé une amélioration de
- 25 50%. Le retard de repousse du poil était tel que les séances ont pu être espacées de 1 mois à 2 mois. Dans certains cas d'hirsutisme généralisé, on a observé une disparition de poils, sur les jambes ou sur la lèvre supérieure. Aucune manifestation toxique ni allergique n'a été constatée.
- 30 Compte tenu des études expérimentales relatées ci-dessus, le complexe enzymatique à activité hydrolysante sur l'AMPC (CEH) peut être utilisée en cosmétique, en composition avec les excipients topiques usuels, notamment pour empêcher ou retarder

der la pousse des poils.

Le CEH sera appliqué après épilation, de préférence à l'aide d'un appareil à ionisation, sous forme d'une solution aqueuse, en particulier une solution tampon ayant un pH 7 à 8, à des
 5 concentrations allant de 1 à 20 g/l, surtout de 2 à 5 g/l (basées sur un CEH lyophilisé ayant une activité d'environ 0,3 unité enzymatique tel que définie plus haut).

On peut aussi l'utiliser sous d'autres formes, par exemple sous forme de crèmes ou de gels contenant de 0,1 à 2% de CEH,
 10 par exemple 0,2% , ainsi que les excipients usuels, ou en pulvérisation sous pression.

L'application se fera par exemple en ionisation par séances mensuelles ou tous les 2 ou 3 mois, suivie d'une application de crème, ou de gel ou de pulvérisation immédiatement après
 15 épilation (au cours des 2 ou 3 jours suivants), selon les besoins.

Exemple de Gel

	CEH	0,2 g
	"Carbopol 930" (carboxyméthylène)	3 g
20	Triéthanolamine	3 g
	Palmitate d'isopropyle	5 g
	Conservateur	0,3 g
	Gluconate de magnésium	0,1 g
	Gluconate de calcium	0,1 g
25	Parfum	0,3 g
	Eau qsp	100 g

Exemple de Crème

	Stéarine	4 g
	Stéarate de glycérol	4 g
	Alcool cétylique	1 g
5	Huile minérale	10 g
	Huile d'amandes douces.....	5 g
	Palmitate d'isopropyle	10 g
	Lecithine soja	1 g
	Lanoline	1 g
10	Triéthanolamine	3 g
	Antioxydant (BHA (R))	0,1 g
	Conservateur	0,3 g
	Parfum	0,2 g
	Gluconate de Mg	0,1 g
15	Gluconate de Ca	0,1 g
	Eau qsp	100 g

Revendications

1. Composition cosmétique à base d'un complexe enzymatique à action hydrolysante sur l'AMPc et d'excipients topiques usuels.
- 5 2. Composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisée par le fait que le complexe enzymatique a été extrait de tissus animaux fraîchement prélevés par broyage, filtration, centrifugation, nouvelle filtration et précipitation par une solution de sulfate d'ammonium saturée, les opérations de filtration et de précipitation pouvant être répétées,
10 et lyophilisation du produit obtenu.
3. Composition cosmétique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée par le fait que le complexe enzymatique à action hydrolysante à l'état lyophilisé a une activité enzymatique sur l'AMPc de l'ordre de 0,1 à 0,4 unités
15 par mg.
4. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous forme d'une solution aqueuse contenant de 1 à 20 g/l de
20 complexe enzymatique.
5. Composition cosmétique selon la revendication 4, caractérisée par le fait que la solution est une solution tampon ayant un pH de 7 à 8.
6. Composition cosmétique selon la revendication 5, caractérisé par le fait que la solution contient de 2 à 5 g/l de
25 complexe enzymatique ayant une activité d'environ 0,3 unité enzymatique.
7. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous forme de crème ou de gel contenant de 0,1 à 2% de complexe
30 enzymatique.

8. Composition cosmétique selon la revendication 7, caractérisée par le fait qu'elle contient environ 0,2% de complexe enzymatique.